

Vergleichende Untersuchung der Dosiswirkungsbeziehung
strahleninduzierter Chromosomenaberrationen in mensch-
lichen Lymphozyten im niederen Dosisbereich bei Anwen-
dung von Feulgen-Orcein-Eisessig- und FPG-Färbung.

Richard Wagner

—
1982
—

Aus der Abteilung für Strahlenbiologie der Gesellschaft
für Strahlen- und Umweltforschung mbH München
Arbeitsgruppe Zytogenetik
(Leiter: Prof. Dr. rer. nat. M. Bauchinger)

Vergleichende Untersuchung der Dosiswirkungsbeziehung
strahleninduzierter Chromosomenaberrationen in mensch-
lichen Lymphozyten im niederen Dosisbereich bei Anwen-
dung von Feulgen-Orcein-Eisessig- und FPG-Färbung.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Richard Wagner
aus
München
1982

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. M. Bauchinger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Spiess

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Nov. 1982



Für
Sieglinde

Gliederung

Seite

1. Einleitung	1
2. Material und Methode	3
2.1. Bestrahlungsbedingungen	4
2.2. Kulturbedingungen	5
2.3. Chromosomenpräparation	7
2.4. Chromosomenfärbung	8
2.4.1. FPG-Färbung (Exp. a und M_2 -Index-Bestimmung)	8
2.4.2. Feulgen-Orcein-Eisessig-Färbung (Exp. b)	10
2.5. Chromosomenanalyse	12
2.6. Statistische Analyse	13
3. Ergebnisse	14
4. Diskussion	22
4.1. Relevanz des niederen Dosisbereichs	22
4.2. Mechanismen der Aberrationsentstehung	24
4.2.1. Dizentrische Chromosomen	24
4.2.2. Azentrische Fragmente	26
4.3. Dosiswirkungsbeziehungen im niederen Dosisbereich ..	27
4.3.1. Konventionelle Färbung	27
4.3.2. FPG-Färbung	34
4.4. Bewertung	40
5. Zusammenfassung	42



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0073

1. Einleitung

Bis heute wurden relativ wenige Untersuchungen über Dosiswirkungsbeziehungen strahleninduzierter Chromosomenaberrationen in menschlichen Lymphozyten für den niederen Dosisbereich von 0,05 - 0,6 Gy (12, 28, 32, 39, 42, 48, 51) durchgeführt. Alle Befunde wurden mit einer konventionellen Chromosomenfärbemethode erhoben, mit der keine Unterscheidung der zu analysierenden Zellen hinsichtlich der Anzahl der bereits durchlaufenen Zellteilungen möglich war.

Schon 1964 wurde auf den wesentlichen Einfluß der Kulturzeit von Lymphozyten auf die Raten strahleninduzierter Chromosomendefekte hingewiesen (13, 14). Da es bei Zellteilungen zu Aberrationsverlusten kommen kann, wurde der Versuch unternommen, die Kulturzeiten auf 48 Stunden zu limitieren. Auf diese Weise sollten nur Zellen der ersten Mitose nach Stimulation (M_1 -Zellen) für die Chromosomenanalyse erfaßt werden.

Mit der von Perry und Wolff (1974) eingeführten FPG-Färbung (fluorescence plus Giemsa), mit der eine eindeutige Unterscheidung der M_1 -Zellen von Zellen in späteren Teilungen ermöglicht wurde, konnte nachgewiesen werden, daß in 48-Stunden-Kulturen bereits mehr als 50% M_2 -Zellen vorhanden sein können (18, 27). Die Anwendung dieser Färbemethode gestattet somit durch ausschließliche M_1 -Auswertung den Einfluß der Zellkinetik auf die Aberrationsausbeute zu eliminieren.

Da im niederen Dosisbereich, anders als bei hohen Dosen, keine strahleninduzierte Mitoseverzögerung zu erwarten ist, somit der aus der ungehemmten Proliferation der Lymphozyten resultierende Aberrationsverlust relativ größer als bei höheren Dosen ist, kann gefolgert werden, daß die ausschließliche M_1 -Auswertung bei FPG-Färbung höhere Aberrationsraten ergibt als die Chromosomenanalyse bei konventioneller Färbung.

Bisher existierten keine im niederen Dosisbereich mit FPG-Färbung erstellten Dosiswirkungskurven. In dieser Arbeit wurde eine vergleichende Untersuchung der Dosiswirkungszusammenhang für dizentrische Chromosomen und acentrische Fragmente mit FPG- und konventioneller Färbung durchgeführt mit dem Ziel, für den medizinischen Strahlenschutz repräsentative Kalibrierkurven zur biologischen Dosisabschätzung außergewöhnlicher Strahlenexpositionen zu erhalten.

2. Material und Methode

Es wurden zwei Experimente durchgeführt mit dem Ziel, im Dosisbereich von 0 - 0,5 Gy (220-kV-Röntgenstrahlen) Dosiswirkungsbeziehungen als Eichkurven zu erstellen und zwar

- a) für Lymphozyten, die sich nach Bestrahlung in der Metaphase ihrer ersten Mitose befanden (Kulturen mit BrdU und FPG-Färbung, s. 2.2., 2.4.1.) und im Vergleich dazu
- b) für Lymphozyten, deren Metaphasen nicht nach der Anzahl der bereits durchlaufenen Mitosen differenziert wurden (Kulturen ohne BrdU und Feulgen-Orcein-Eisessig-Färbung, s. 2.2., 2.4.2.).

Für das erste Experiment (Exp. a) wurden 6 ml Blut eines 25-jährigen, männlichen, gesunden Spenders (Eigenblut) auf 6 je 1 ml fassende Bestrahlungskammern verteilt, von denen eine unbestrahlt blieb und deren Inhalt als Kontrolle diente. Die anderen 5 wurden mit Röntgenstrahlen unterschiedlicher Dosis bestrahlt.

Für das zweite Experiment (Exp. b) wurde Blut desselben Probanden auf 12 Bestrahlungskammern verteilt, von denen 2 unbestrahlt blieben, während die anderen 10 jeweils paarweise mit denselben Dosen wie oben bestrahlt wurden. Aus diesen 12 Blutproben wurden 6 -eine je Dosis einschließlich Kontrolle- entsprechend dem für Exp. b beschriebenen Vorgehen behandelt. Die andere Hälfte der Blutproben wurde denselben Kulturbedingungen und Färbeprozeduren wie in Exp. a unterzogen, um, was nur nach BrdU-Zugabe und entsprechender Färbung möglich ist, den M_2 -Index (Anzahl der Zellen in der Metaphase der zweiten Mitose in Prozent auf 100 randomisiert und sukzessive betrachteten Zellen) zu bestimmen.

Auf diese Weise war es möglich, einen Hinweis auf die Zellproliferation in den Kulturen zu bekommen.

2.1. Bestrahlungsbedingungen

Frisch aus einer oberflächlichen Armvene entnommenes heparinisiertes Blut (300 E Heparin auf 10 - 20 ml Vollblut) wurde auf 6 (Exp. a) respektive 12 (Exp. b) je 1 ml fassende flache Polytetrafluoräthylen- (Teflon-)kammern (sogenannte Bestrahlungskammern) von je 24,5 mm Innendurchmesser, die beidseitig mit Hostaphanfolien (10 μ m dick) verschlossen waren, verteilt. Die Kammern wurden in einem Transportgefäß, das den Blutproben eine Temperatur von $37 \pm 1^{\circ}$ Celsius garantierte, in den Bestrahlungsraum gebracht. Eine Blutprobe, die als Kontrolle diente, blieb unbestrahlt, den anderen 5 wurde je eine Dosis von 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 und 0,5 Gy appliziert. Die Bestrahlung erfolgte mit einem Röntgenapparat der Firma Siemens, "Stabilipan", mit 220-kV-Röntgenstrahlen bei 14 mA. Die Temperatur in einem Bestrahlungsgehäuse aus Plexiglas war konstant $37 \pm 0,1^{\circ}$ Celsius. Der Focus-Objekt-Abstand betrug 58,9 cm, die Filterung 3,35 mm Kupfer.

Der Messung der Röntgenstrahlendosis wurde die sogenannte Fricke-Dosimetrie (45) zugrundegelegt, ein von Fricke und Morse 1927 entwickeltes Meßverfahren, das Strahlendosen mit einer Genauigkeit von 1 - 2% zu messen imstande ist und das auf dem Prinzip der durch die absorbierte Strahlenenergie verursachten Oxidation von Ferro- in Ferrisulfat beruht, dessen Konzentration spektrophotometrisch bei 302 nm gemessen wird (bei dieser Wellenlänge ist der molare Extinktionskoeffizient des Ferroions praktisch null und der des Ferrisulfats $2197 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Die Fricke-Dosimeter-Lösung besteht aus 0,001 M FeSO_4 und 0,8 n H_2SO_4 , das über die Bil-

dung von Radikalen das zweiwertige Eisen oxidiert. Die absorbierte Dosis wird nach folgender Gleichung errechnet:

$$D = \frac{N \cdot \Delta OD \cdot 100}{\epsilon \cdot \rho \cdot 10^3 \cdot G(\text{Fe}^{3+})} \quad \text{eV/g}$$

wobei N = Avogadro'sche Zahl

ΔOD = Differenz der optischen Dichte zwischen bestrahlter Probe und Referenzprobe

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

ρ = spezifische Dichte der Lösung

$G(\text{Fe}^{3+})$ = Anzahl der oxidierten Eisenionen pro 100 eV absorbiertener Energie = 14,5 für 220 kV

Unter Einschluß des Umrechnungsfaktors $F = 6,24 \cdot 10^{-13} \text{ rad/eV}$ ergibt sich für die Dosis $D = 2,95 \cdot 10^4 \cdot \Delta OD \text{ rad}$, wobei $1 \text{ rad} = 0,01 \text{ Gy}$.

Bei einer Bestrahlungsdauer von 40 Minuten ergab sich für 3,35 mm Kupferfilterung, 14 mA und 220 kV bei einem Fokus-Objekt-Abstand von 58,9 cm eine ΔOD von 0,0217, was einer Dosisleistung von 0,16 Gy/min entspricht. Da eine lineare Beziehung zwischen Dosis und Bestrahlungszeit existiert, wurde die Höhe der Dosis über die Veränderung der Bestrahlungszeit reguliert.

2.2. Kulturbedingungen

Die folgende Beschreibung der Kulturbedingungen gilt, soweit nicht anders erwähnt, für Exp. a und b:

Das Vollblut, das in je einer der 1 ml fassenden Bestrahlungskammern enthalten war, wurde in je zwei Teile zu 0,5 ml portioniert und diese jeweils in eine bereits vorbereitete standardisierte Mikrokultur überführt. Jede Mikrokultur ent-

hielt folgende Zusammensetzung:

- 4 ml F-10 Medium (Gibco Europe, nutrient mixture, HAM), das Aminosäuren, Vitamine, anorganische Salze und andere Komponenten enthält und dem prophylaktisch gegen Kontamination durch bakterielle Erreger pro ml Medium 200 IE Penicillin-G (Grünenthal) und 1 mg Streptomycin (Streptothentat^R, Grünenthal) zugesetzt war.
- 0,5 ml TC fetales Kälberserum, (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA).
- 0,13 ml Phytohämagglutinin M, PHA M (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), ein mitogenes Extrakt aus *Phaseolus vulgaris*, unter dessen Einfluß sich die kleinen T-Lymphozyten zu blastenartigen Zellen transformieren und in die Mitose eintreten.

In alle Kulturen, deren Chromosomen einer FPG-Färbung (s. 2.4.1.) unterzogen werden sollten (Exp. a), wurden zusätzlich 20 µl (= 5,8 µg/ml Endkonzentration) 5-Bromdesoxyuridin, BrdU (SERVA), pipettiert.

Alle Bestandteile wurden steril in 10 ml fassende Erlenmeyerkölbchen gegeben. Die BrdU enthaltenden Kulturen wurden darüberhinaus mit Silberfolie vollständig umwickelt, um sie vor Lichteinfall zu schützen, da DNA-Moleküle, deren Thymidin durch BrdU substituiert wurde, durch Licht einer Photolyse ausgesetzt und somit zerstört würden.

Die verschlossenen Kulturgefäße wurden darauf zur vollständigen Durchmischung der einzelnen Bestandteile leicht geschwenkt und bei einer konstanten Temperatur von 37° C für 48 Stunden inkubiert. Die PHA-Zugabe markierte den Start der Inkubationszeit. Drei Stunden vor Kulturrende wurde allen Kulturen jeweils 0,15 µg/ml Endkonzentration des Spindelgiftes N-desacetyl-N-methyl-Colchicin, Colcemid^R (CIBA)

zur Anreicherung der Metaphasen zugegeben. Bei den Kulturen mit BrdU (Exp. a) erfolgte der Colcemidzusatz vollkommen im Dunkeln, wiederum, um einer Photolyse vorzubeugen.

2.3. Chromosomenpräparation

Die Chromosomenpräparation erfolgte, modifiziert nach Arakaki und Sparkes (2), für die Mikrokulturen aus Exp. a und b in gleicher Weise:

Nach der 48-stündigen Inkubationszeit wurde die Kulturflüssigkeit jeweils in ein graduiertes Zentrifugengläschen umgefüllt, fünf Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellsediment wurde daraufhin mit 5 ml Hank'scher Lösung (37° C) suspendiert, wiederum fünf Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert und die überstehende Lösung abgesaugt. Nun wurde der Bodensatz mit 5 ml einer 37° C warmen hypotonen Lösung, bestehend aus sterilem Aqua bidest. und Hank'scher Lösung im Verhältnis 3:1, suspendiert und für elf Minuten bei 37° C inkubiert. Diese Behandlung hat zum Ziel, die Erythrozyten platzen, die Lymphozyten aber infolge ihrer relativ stärkeren osmotischen Resistenz lediglich aufquellen zu lassen. Nach der elfminütigen Inkubation erfolgte wiederum, wie oben beschrieben, das Zentrifugieren und Absaugen.

Anschließend wurde das Sediment mit je 3 ml eines Gemisches aus Methylalkohol und Eisessig (im Verhältnis 3:1) fixiert; daran schloß sich wiederum das Zentrifugieren und Absaugen an. Nach erneuter Fixativzugabe und Suspension durfte die Lösung 20 Minuten einwirken, um dann von neuem zentrifugiert und abgesaugt zu werden. Der verbliebene Bodensatz aus gequollenen, im Metaphasestadium angereicherten Lymphozyten

wurde nochmals in circa 0,5 ml Fixativ suspendiert. Da der bis hier beschriebenen Behandlung jeweils zwei Mikrokulturen pro Dosis unterzogen worden waren, wurden die zusammengehörigen Suspensionslösungen jetzt in ein Zentrifugengläschen vereinigt. Jeweils drei Tropfen dieser Suspension wurden auf fettfreie, in Eiswasser gekühlte Objektträger aufgetropft, die schnell durch eine Bunsenflamme geführt wurden. Die beim Auftropfen entstehenden mechanischen Kräfte und die Oberflächenspannung, verursacht durch das schnelle Verdunsten beim Erhitzen, führen endlich zum Platzen der Lymphozytenmembran und zum Ausbreiten der Metaphasechromosomen.

2.4. Chromosomenfärbung

Zum Vergleich der Aberrationsausbeute von peripheren T-Lymphozyten des menschlichen Blutes, die mit jeweils derselben Dosis bestrahlt und unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden, von denen auf der einen Seite aber nur M_1 -Zellen (Lymphozyten, die sich nach PHA-Stimulation in der Metaphase der ersten Mitose nach Bestrahlung befinden), auf der anderen Seite aber alle Metaphasen, unabhängig von der Anzahl der bereits durchlaufenen Mitosen, ausgewertet wurden, fanden zwei verschiedene Methoden der Chromosomenfärbung ihre Anwendung.

2.4.1. FPG-Färbung (Exp. a und M_2 -Index-Bestimmung)

Die FPG-Färbung (fluorescence plus Giemsa) beruht auf einer von Apelt, Kolin-Gerresheim und Bauchinger (1) modifizierten Methode nach Perry und Wolff (33) und ermöglicht es, M_1 -Zellen von M_2 -Zellen und solchen in späterer Teilung zu unterscheiden:

3-7 Tage nach der Präparation wurden die Objektträger für 20 Minuten in einer Hoechst-Farbstofflösung "33 258" der Konzentration $0,5 \mu\text{g/ml}$ gefärbt und anschließend in Aqua bidest. kurz gespült. Dann wurden sie in mit Weise-Puffer gefüllte Kunststoffschalen so gelegt, daß sie eben bedeckt waren und dann für 90 Minuten dem Licht einer 40-Watt UV-Lampe (Osram L 40 W/73; maximale Lichtintensität bei 350 nm) im Abstand von 20 cm ausgesetzt. Hierauf wurden die Präparate in eine 60°C heiße Lösung von 2 x SSC (sodiumchlorid-trissodiumcitrat) überführt, 30 Minuten dort belassen und im Anschluß daran wieder kurz in Aqua bidest. gespült. Es folgte nun die Färbung in 3%igem Giemsa (Merck, Darmstadt), gelöst in Weise-Puffer. Nach erneuter Spülung in Aqua bidest. wurden die Objektträger luftgetrocknet.

Einige Stunden später wurden sie in ein Isopropyl-Xylol-Gemisch (im Verhältnis 1:1) überführt, zweimal in Xylol getaucht, mit Caedax^R (Merck, Darmstadt) eingedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.

In Abb. 1 wird das Prinzip der FPG-Färbung schematisch erläutert: Periphere T-Lymphozyten des menschlichen Blutes befinden sich in der G_0 -Phase des Zellzyklus und sind funktionell einsträngig. Nach PHA-Stimulation treten sie in die G_1 -Phase ein, durchlaufen die Synthesephase und die G_2 -Phase und beginnen die Mitose, die durch Colcemid in der Metaphase arretiert wird. In der Synthesephase, in der die DNA repliziert wird, wird nun, wenn BrdU in genügend hoher Konzentration vorhanden ist, BrdU anstelle des Thymidins eingebaut. Nach der 1. Synthesephase, in der beide Chromatiden je ein BrdU-substituiertes DNA-Molekül enthalten, also unifilar substituiert sind, zeigen beide Chromatiden in der Metaphase eine gleich dunkle Färbung und sind nicht voneinander unterscheidbar (M_1 -Zellen).

Da nach der 2. Synthesphase jeweils eine Chromatide beide DNA-Stränge (bifilar) mit BrdU substituiert enthält, die andere Chromatide aber nur unifilar, zeigen die beiden Chromatiden in der Metaphase unterschiedliche Färbung. In diesen sog. "Harlekin"-Chromosomen sind die bifilar substituierten Chromatiden hell, die unifilar substituierten dunkel gefärbt (M_2 -Zellen).

2.4.2. Feulgen-Orcein-Eisessig-Färbung (Exp. b)

Diese Art der Färbung beruht auf einer stöchiometrisch verlaufenden Reaktion des Schiff'schen Reagens (Sulfinsäure) mit dem durch die HCl-Hydrolyse in die Aldehydform überführten Zucker der DNA. Dabei entsteht ein stabiler roter Farbstoff. Mit diesem Verfahren werden die Chromosomen sämtlicher Mitosen gleichartig angefärbt, was also keine Unterscheidungsmöglichkeit hinsichtlich der Anzahl der bereits durchlaufenen Mitosen erlaubt.

Nachdem die Präparate zunächst in 1 n Salzsäure bei 60° C für zehn Minuten hydrolysiert worden waren, wurden sie kurz in kaltem Leitungswasser gespült und dann in ein Färbbad mit basischem Fuchsin (SERVA, Feinbiochemica Heidelberg), das die oben erwähnte Sulfinsäure enthält, gegeben. Dann wurden sie wiederum mit kaltem Leitungswasser und anschließend mit Aqua bidest. gespült, worauf sie einige Stunden bei Raumtemperatur trocknen konnten.

Die trockenen Objektträger wurden nun für zehn Minuten in eine Orcein-Eisessig-Farblösung getaucht und daraufhin zum Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes und zur Entwässerung der Präparate in eine ansteigende Alkoholreihe überführt: 1x Äthylalkohol 96%, 2x Isopropylalkohol 99%, 1x Isopropylalkohol-Xylol-Gemisch im Verhältnis 1:1

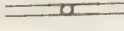
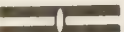
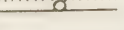
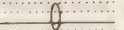
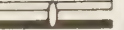
Zyklusphasen	1. Zellzyklus			2. Zellzyklus		
	G ₁ -Phase	Synthesephase	Metaphase	G ₁ -Phase	Synthesephase	Metaphase
Schema						
		+ BrdU			+ BrdU	



Abb. 1. Chromosomenreplikation in zwei aufeinanderfolgenden Zellzyklen:
a) Metaphase im 1. Zellzyklus
b) Metaphase im 2. Zellzyklus ("Harlekin"-Chromosomen).

und 2x Xylol. Anschließend wurden die Präparate mit Caedax^R (Merck, Darmstadt) eingedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.5. Chromosomenanalyse

Es wurden in beiden Experimenten pro Dosis und Kontrolle je 1000 Zellen ausgewertet.

Zunächst wurden in 250-facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop die Objektträger mäanderförmig nach gut beurteilbaren Metaphasen abgesucht und deren Kreuztischkoordinaten abgedruckt. Gütekriterien waren die bereits bei dieser Vergrößerung mögliche Differenzierbarkeit der Chromatiden, gute Färbung der Chromosomen und Geschlossenheit der Metaphasenplatte (zerrissene Metaphasen mit weiter Verstreuung der Chromosomen wurden nicht registriert).

Für die Chromosomenanalyse aus Exp. a wurden nur Metaphasen der 1. Mitose ausgewählt.

Die Auswertung erfolgte bei 1600-facher Vergrößerung mit Ölimmersion im Durchlicht und mit Grünfilter (Exp. a), da die FPG-gefärbten Chromosomen sehr dunkel sind, bzw. im Phasenkontrast (Exp. b).

In die Statistik gingen nur die Metaphasen ein, die 46 Zentromere aufwiesen. Konnte bei mikroskopischer Betrachtung ein vermuteter Defekt nicht eindeutig bestimmt werden, wurde eine Photographie der betreffenden Metaphase angefertigt und diese dann ausgewertet.

Die so beurteilten Metaphasen wurden nach einem Ordnungsschema von Bauchinger und Hug (5), bzw. Schmid und Bauchinger (40) klassifiziert:

N-Zellen: Zellen ohne erkennbare Defekte (normal).

S-Zellen: Zellen mit strukturellen Chromosomendefekten:

- Bruchstückverluste ohne sichtbare Strukturumbauten: Chromatidbrüche, Defizienzen, azentrische Fragmente (ace, s. Abb. 1), interstitielle, sog. "minute" (min)-Deletionen (punktförmige azentrische Fragmente, die kleiner als der Chromatidendurchmesser sind), azentrische Ringe (R_0).
- Strukturumbauten: Chromatidaustauschfiguren (exchange), multizentrische Chromosomen: dizentrische (dic, s. Abb. 1), trizentrische Chromosomen (tric), Ringchromosomen (R_C), atypische, nicht klassifizierbare Chromosomen (at).

U-Zellen: Zellen mit unspezifischen Chromosomendefekten, die nicht auf einer Diskontinuität der Chromosomenstruktur beruhen (gaps, isogaps, s. Abb. 1).

2.6. Statistische Analyse

Zur Darstellung der Dosiswirkungsbeziehungen von dizentrischen Chromosomen und azentrischen Fragmenten wurden Dosiswirkungskurven konstruiert. Die mathematische Definition dieser Kurven erfolgte durch eine nichtparametrische Anpassung der experimentellen Werte an grundlegende Modelle der Dosiswirkungsbeziehung, die auf biophysikalischen und treffertheoretischen Vorstellung basieren (vgl. 4.2.1., 4.2.2.).

Die in bester Übereinstimmung mit den beobachteten Daten befindlichen theoretischen Dosiswirkungskurven wurden nach einem Rechnerprogramm von Kellerer und Mitarb. (23, 24) erstellt, wobei die Anpassung nach dem Prinzip der kleinsten Quadrate erfolgte.

3. Ergebnisse

Getrennt nach den beiden Färbemethoden sind die beobachteten Aberrationen in Tab. I und II aufgeschlüsselt.

Außer den isoliert auftretenden azentrischen Fragmenten, minutes und azentrischen Ringen wurden in Zellen, die zusätzlich zu einer Austauschaberration mehrere nicht identische Fragmente enthielten, jeweils ein Fragment unter der Annahme kompletter Austauschvorgänge (Bauchinger und Götz (4) fanden in G-Banden-Analysen, daß nur 10% der Austauschvorgänge inkomplett waren) jener Austauschaberration zugeordnet und die überzähligen Fragmente als Ergebnis eigenständiger Bruchereignisse gewertet.

Bei Feulgen-Orcein-Eisessig-Färbung wurden in Zellen mit Austauschaberrationen und morphologisch identischen Fragmenten letztere nur einfach gezählt, da es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Zellen der zweiten Mitose handelte und das Fragment nach der Synthesephase als "Zwillingsform" vorlag.

Beim Vergleich der Absolutzahlen der Chromosomenschäden ergab sich, daß, über den gesamten Dosisbereich betrachtet, bei FPG-Färbung die Ausbeute an dizentrischen Chromosomen doppelt so hoch, die an azentrischen Fragmenten ca. dreimal so hoch wie bei konventioneller Färbung war.

Abb. 2 zeigt die Dosiswirkungskurven für azentrische Fragmente ($ace + R_0 + min$) bei FPG- und Feulgen-Orcein-Eisessig-Färbung im doppelt-logarithmischen Maßstab (wie von Kellerer und Hug (25) für den niederen Dosisbereich gefordert wurde), der Kontrollwert ($c = 0,004$) wurde für die Berechnungen jeweils subtrahiert. Die Dosiswirkungsbeziehung war für beide Färbemethoden linear. Bei der Anpassung des linear-quadratischen Modells war $\beta = 0$.

FPG-Färbung:

-lineare Funktion: $y = k \cdot D$, wobei $k = 0,11$; ($\varphi = 2,712$)

-linear-quadratische Funktion: $y = \alpha \cdot D + \beta \cdot D^2$,
wobei $\alpha = 0,11$, $\beta = 0$; ($\varphi = 2,712$)

Feulgen-Orcein-Eisessig-Färbung:

-lineare Funktion: $y = k \cdot D$, wobei $k = 0,0215$; ($\varphi = 0,415$)

-linear-quadratische Funktion: $y = \alpha \cdot D + \beta \cdot D^2$,
wobei $\alpha = 0,0215$, $\beta = 0$; ($\varphi = 0,415$)

y = Aberrationsausbeute

k , α , β = Koeffizienten der Aberrationsinduktion

D = Dosis in Gy

φ = Minimum der kleinsten Quadrate

In Abb. 3 sind für beide Färbemethoden die Dosiswirkungsbeziehungen für dizentrische Chromosomen doppelt-logarithmisch dargestellt. Da in den unbestrahlten Proben dieses Experimentes keine dizentrischen Chromosomen auftraten, wurde der Standardkontrollwert des hiesigen Labors subtrahiert ($c = 3$ dic/10 000 Zellen), der auf der Auswertung von ca. 19 000 Zellen unbestrahlter Kontrollpersonen beruht.

Für beide Färbemethoden konnte hier das linear-quadratische Modell am besten angepaßt werden:

FPG-Färbung: $y = \alpha \cdot D + \beta \cdot D^2$,

wobei $\alpha = 0,03$, $\beta = 0,05$; ($\varphi = 5,39$), $\lambda = \alpha/\beta = 0,6$ Gy;

Feulgen-Orcein-Eisessig-Färbung: $y = \alpha \cdot D + \beta \cdot D^2$,

wobei $\alpha = 0,00114$, $\beta = 0,063$, ($\varphi = 0,912$);

$\lambda = \alpha/\beta = 0,018$ Gy;

λ = Dosis, bei der lineare und quadratische Komponente gleich groß sind (vgl. 25). Bei Dosen $< \lambda$ dominiert die lineare, bei Dosen $> \lambda$ die quadratische Komponente.

In den Säulendiagrammen der Abb. 4 ist der prozentuale Anteil der M_2 -Zellen in Abhängigkeit von der absorbierten Dosis dargestellt. Dieser M_2 -Index wurde, wie in Material und Methode beschrieben, aus Blutproben des Exp. b ermittelt.

Das Diagramm zeigt, mit Ausnahme der Dosen 0,05 und 0,1 Gy, zwischen 0 und 0,5 Gy einen sehr einheitlichen M_2 -Index zwischen 26 und 29,5%.

Strukturelle Chromosomendefekte													
Dosis (Gy)	Zahl der ausge- werteten Zellen	Unspezifische Chro- mosomendefekte		S-Zellen (%)	Aberrationen vom Chromatid- typ pro Zelle		Aberrationen vom Chromoso- mentyp pro Zelle						
		U-Zellen (%)	gaps pro Zelle		exchange	Chroma- tidbruch	ace	min	R ₀	dic	R _C	at	
Kontrolle	1000	1,5	0,017	0,8	0,003	0,001	0,003	0,001	-	-	-	-	0,001
0,05	1000	3,1	0,031	1,3	0,001	0,001	0,008	0,001	-	0,001	-	-	-
0,1	1000	3,7	0,041	3,2	-	0,003	0,018	0,003	-	0,009	-	-	-
0,2	1000	3,4	0,043	4,5	0,001	0,004	0,026	0,002	0,001	0,009	0,004	-	-
0,4	1000	3,7	0,039	5,8	0,003	-	0,041	0,001	-	0,016	0,001	0,003	0,003
0,5	1000	4,0	0,042	9,9	0,004	0,007	0,057	0,004	0,001	0,031	0,004	-	-

Tab. I. Häufigkeit verschiedener Zell- und Aberrationstypen nach Röntgenbestrahlung mit verschiedenen Dosen. FPG-Färbung. (Erklärung der Abkürzungen S. 13).

Unspezifische Chromosomendefekte		Strukturelle Chromosomendefekte											
		Zahl der ausgewerteten Zellen	U-Zellen (%)		S-Zellen (%)	Aberrationen vom Chromatid-typ pro Zelle		ace	min	R _O	dic	R _C	at
gaps pro Zelle	exchange		Chromatidbruch										
Kontrolle	1000	1,6	0,016	0,8	0,001	0,003	0,004	-	-	-	-	-	-
0,05	1000	2,2	0,022	1,1	0,001	0,002	0,006	-	-	0,001	0,001	-	-
0,1	1000	1,0	0,011	1,0	-	0,002	0,007	-	-	0,001	-	-	-
0,2	1000	0,5	0,005	1,5	-	0,002	0,010	-	-	0,003	-	-	-
0,4	1000	1,4	0,016	2,4	0,001	0,001	0,012	-	-	0,009	0,001	-	-
0,5	1000	1,4	0,016	4,1	0,004	0,001	0,013	0,001	-	0,019	0,004	0,001	0,001

Tab. II. Häufigkeit verschiedener Zell- und Aberrationstypen nach Röntgenbestrahlung mit verschiedenen Dosen. Feulgen-Orcein-Eisessig-Färbung. (Erklärung der Abkürzungen S. 13).

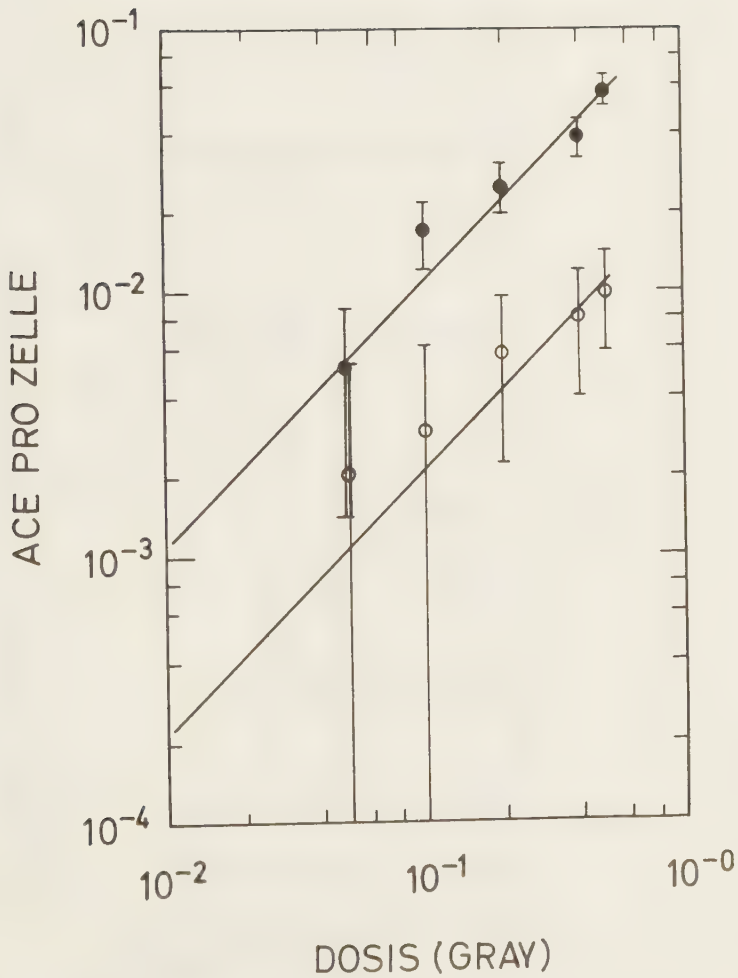


Abb. 2. Lineare Dosiswirkungsbeziehung ($\pm$ Standardfehler nach Poisson) für azentrische Fragmente mit FPG- (●) und Feulgen-Orcein-Eisessig- (○) Färbung.

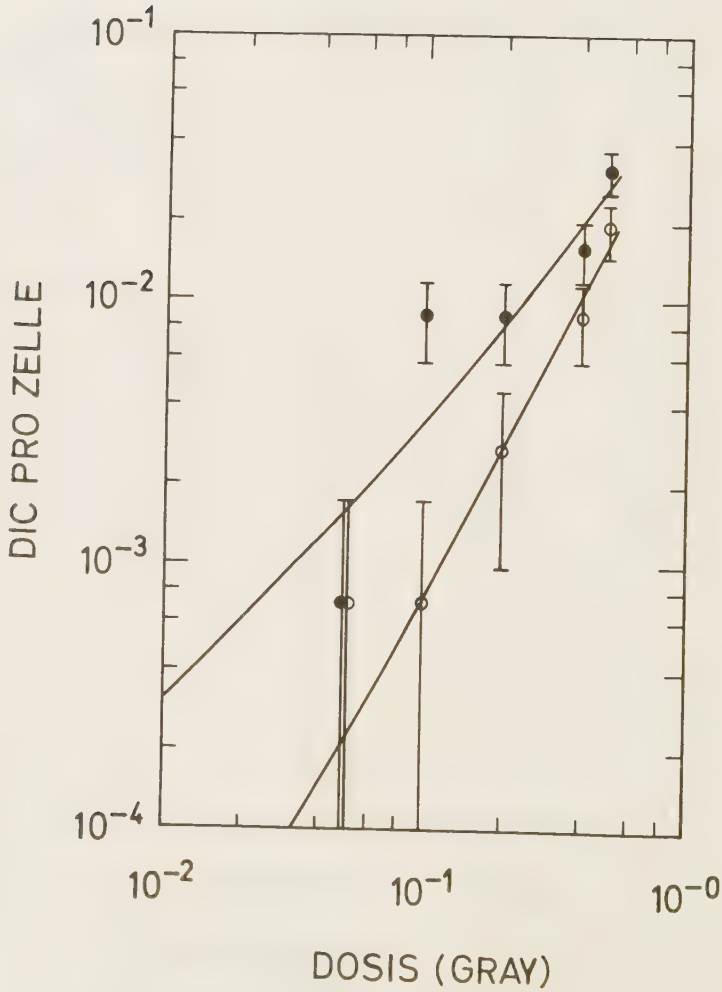


Abb. 3. Linear-quadratische Dosiswirkungsbeziehung ($\pm$ Standardfehler nach Poisson) für dizentrische Chromosomen mit FPG- (●) und Feulgen-Orcein-Eisessig- (○) Färbung.

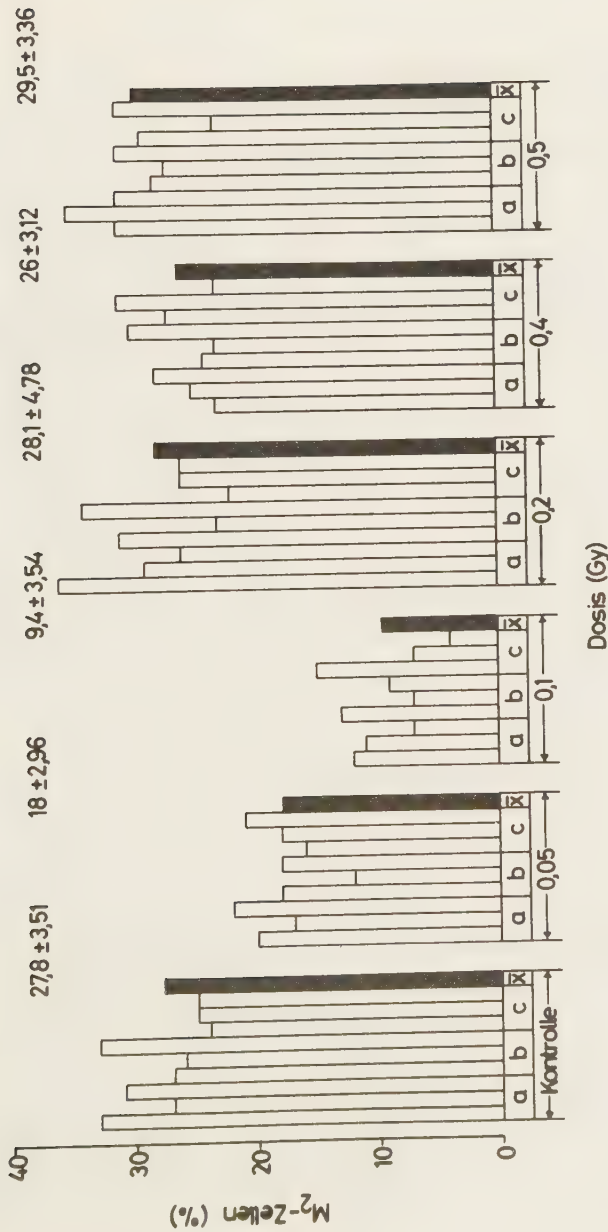


Abb. 4. Prozentualer Anteil der M₂-Zellen in Abhängigkeit von der absorbierten Dosis. a, b, c repräsentieren verschiedene Präparate. Pro Präparat wurden je 3 x 100 Zellen ausgezählt. Die schwarzen Säulen entsprechen jeweils dem Mittelwert ± Standardabweichungen aus den neun Einzelzählungen.

4. Diskussion

4.1. Relevanz des niederen Dosisbereichs

Hall und Miller (21) veröffentlichten 1981 Studien über die strahleninduzierte onkogene Transformation von Zelllinien aus Hamsterembryonen in vitro. Über einen weiten Dosisbereich hinweg, bis herunter zu 0,01 Gy Röntgenstrahlen wurden die Zellen auf Anzeichen maligner Umwandlung untersucht. Unter anderem zeigten diese Experimente auf, daß bei einer Dosis von 1,0 Gy sowohl deren Fraktionierung in 2 bis 4 Teildosen, als auch ihre Protrahierung über 6 Stunden, einen deutlichen Anstieg der Transformationsraten im Vergleich zu einer Akutdosis in derselben Höhe zur Folge hatte, während bei höheren Dosen Fraktionierung und Protrahierung bekanntermaßen die Wirksamkeit ionisierender Strahlung auf gesunde Zellsysteme vermindern.

Obwohl natürlich bei Strahlenexposition in vivo wesentlich komplexere Verhältnisse vorliegen, sind diese experimentellen Befunde doch bedeutsam für eine Abschätzung des strahleninduzierten Krebsrisikos beim Menschen nach Expositionen mit niederen Dosen, wie sie bei diagnostischen ("fraktionierte Dosen") oder therapeutischen Maßnahmen oder beruflich erfolgt sein können.

Da auch weitgehend anerkannt ist, daß maligne hämatologische Veränderungen und andere Karzinosen sowie mutagene Effekte unter anderem auch als Spätfolge ionisierender Strahlung interpretiert werden können, sind wirksame Strahlenschutzmaßnahmen unerlässlich.

Ein wesentlicher Aspekt ist dabei, z.B. bei beruflicher Strahlenexposition, die aufgenommene Dosis möglichst genau

zu bestimmen. Dies geschieht üblicherweise mit Hilfe physikalischer Dosimeter (Filmplaketten, Füllhalterdosimeter), die am Körper getragen werden.

Wenn nun etwa bei einem Strahlenunfall keine Dosimeter verfügbar waren, oder bei beruflicher Exposition unklare physikalische Messungen vorliegen, kann auch eine biologische Dosisabschätzung vorgenommen werden. Die gegenwärtig exakteste Methode basiert auf der Bestimmung des Chromosomenschadens in peripheren Lymphozyten. Voraussetzung dafür ist zunächst die Analyse der Dosiswirkungsbeziehung nach in vitro Bestrahlung. Die daraus resultierenden Kalibrierkurven sind die Grundlage für die Dosisbestimmung aus Blutproben strahlenexponierter Personen.

Im allgemeinen umfassen die Kalibrierkurven einen Dosisbereich von 0,2 - 4,0 Gy, gelegentlich sogar bis 8,0 Gy. Dies hat zur Folge, daß für die Abschätzung von Strahlenbelastungen, wie sie im Strahlenschutz relevant sind, von hohen zu niedrigen Dosen extrapoliert werden muß.

Dies kann jedoch nur bedingt akzeptiert werden, da, wie in 4.2. noch erläutert wird, für hohe und niedere Dosisbereiche verschiedene mathematische Beschreibungen der Dosiswirkungsbeziehung anzuwenden sind. So fanden Luchnik und Sevankaev (32), daß durch niedere Dosen einer Co- γ -Strahlung (0,05 - 0,4 Gy) tatsächlich höhere Aberrationsraten induziert wurden, als man sie durch Extrapolation aus Dosiswirkungskurven, die mit Dosen bis zu 4,0 Gy erstellt waren, errechnen konnte. Für 250-kV-Röntgenstrahlen wurden von Kučerová und Mitarb. (28) allerdings gerade entgegengesetzte Befunde publiziert.

Aus praktischen Gründen, aber auch im Hinblick auf das Verständnis der Mechanismen der Abberationsentstehung ist somit die Erstellung von Kalibrierkurven in einem Dosisbereich von 0,05 - 0,5 Gy wichtig.

4.2. Mechanismen der Aberrationsentstehung

Nach einer von Stadler (46) vorgeschlagenen und von Sax (35-38) untermauerten Hypothese entstehen Aberrationen primär durch direkte oder indirekte Brüche beim Durchgang eines ionisierenden Teilchens (oder auch spontan, vgl. Kontrolle) durch die kontinuierliche Struktur des Interphasechromosoms oder bei der Passage eines ionisierenden Teilchens in Chromosomennähe. Die Bruchenden können sich entweder zu ihrer ursprünglichen Form restituieren, sich mit anderen Bruchenden zu neuen Konfigurationen vereinigen (Reunion) oder aber offen bleiben. Sämtliche intra- und interchromosomale Strukturumbauten (exchange-Aberrationen), zu deren Entstehung mindestens zwei Bruchflächen notwendig sind, werden durch den Reunionsprozeß gebildet. Die Bruchenden von azentrischen Fragmenten liegen als stabilisierte Diskontinuitäten vor.

4.2.1. Dizentrische Chromosomen

Die Experimente von Sax (35-38) mit locker ionisierenden Röntgenstrahlen in Tradescantia-Mikrosporen zeigten, daß Ein-Bruch-Aberrationen, die beim Durchgang eines ionisierenden Teilchens erzeugt werden, linear mit der Röntgenstrahlendosis zunehmen. Die Häufigkeit von Aberrationen, zu deren Entstehung Zwei-Bruch-Ereignisse mit anschließendem Strukturaustausch notwendig sind, nahmen jedoch mit dem Quadrat der Dosis zu, was auf die Wechselwirkung von zwei unabhängig voneinander entstandenen Brüchen, induziert durch zwei ionisierende Teilchen, hinweist.

1946 postulierten Catchside und Mitarb. (17) unter Berücksichtigung von Überlagerungen linearer und quadratischer

Komponenten bei Dosiswirkungsbeziehungen locker ionisierender Strahlen, daß die beiden Primärläsionen von Austauschaberrationen zum einen gleichzeitig durch die Bahnspur eines ionisierenden Teilchens (lineare Komponente $\alpha \cdot D$), zum anderen durch die Bahnspuren zweier voneinander unabhängiger ionisierender Teilchen (quadratische Komponente $\beta \cdot D^2$) induziert werden. Mathematisch kann dies durch ein Polynom zweiten Grades formuliert werden:

$$y = c + \alpha \cdot D + \beta \cdot D^2.$$

Die Anpassung dieses linear-quadratischen Modells an die empirischen Befunde z.B. für dizentrische Chromosomen, nach Exposition mit locker ionisierenden Strahlen in Dosisbereichen bis zu 8,0 Gy wurde mehrfach bestätigt (6, 8, 10, 20, 30, 43, 48) und ist heute allgemein anerkannt.

Dieses Modell gilt allerdings nur bedingt für den niederen Dosisbereich, in dem die quadratische zugunsten der linearen Komponente zusehends abnimmt, da die für einen Austausch erforderlichen zwei Primärläsionen in zunehmendem Maße gleichzeitig durch die Energiedeposition eines einzigen ionisierenden Teilchens induziert werden. Auch die Wahrscheinlichkeit, daß zwei unabhängig voneinander entstandene Primärläsionen miteinander unter Bildung z.B. eines dizentrischen Chromosoms in Wechselwirkung treten, ist im niederen Dosisbereich geringer.

Die Dosiswirkungsbeziehung für Zwei-Bruch-Aberrationen sollte demnach besser mit dem linearen Modell $y = c + k \cdot D$ zu vereinbaren sein.

4.2.2. Azentrische Fragmente

Die in Übereinstimmung mit Buckton (11) von Bauchinger und Götz (4) mittels G-Banden-Färbung gemachten Beobachtungen, daß die meisten azentrischen Fragmente als terminale Deletionen einzustufen sind, konnten hier für beide Färbemethoden durch die Anpassung des linearen Modells bestätigt werden. In der größten Zahl der Fälle erzeugte also der Durchgang eines ionisierenden Teilchens eine Chromosomendiskontinuität, die einen verkürzten zentrischen Chromosomenteil und ein azentrisches Bruchstück mit jeweils einer stabilisierten Bruchfläche zur Folge hatte.

Unter Verwendung obiger, mit Bandenfärbung erhobener Befunde, zeigten Schmid und Bauchinger (41), daß erst bei höheren Strahldosen zunehmend auch Zwei-Bruch-Ereignisse zur Entstehung von azentrischen Fragmenten beitrugen (intrachromosomale Zwei-Bruch-Ereignisse wie z.B. interstitielle Fragmente, oder interchromosomale Zwei-Bruch-Ereignisse wie z.B. zusammengesetzte azentrische Fragmente). Bei 240 R wurde z.B. ein Verhältnis von ein-Bruch zu zwei-Bruch bedingten azentrischen Fragmenten von 61:39 beobachtet.

Innerhalb des in der vorliegenden Arbeit benutzten niedrigen Dosisbereichs dürfte jedoch der durch zwei Bahnsuren und zwei Brüche erzeugte Anteil azentrischer Fragmente nur sehr klein sein, so daß analog den treffertheoretischen Erwartungen eine lineare Dosiswirkungsbeziehung nachgewiesen werden konnte.

Wie Tab. I und II und Abb. 2 zeigen, waren die Raten für azentrische Fragmente bei konventioneller Färbung geringer

als bei FPG-Färbung (1:3), was durch den Aberrationsverlust bei Zellteilungen (s. 4.3.2.) bedingt ist. In der hier gefundenen Größenordnung übertrifft dies allerdings weit die Berechnungen von Carrano und Heddle (16), die diesen Aberrationsverlust mit nur 20% angaben.

4.3. Dosiswirkungsbeziehungen im niederen Dosisbereich

4.3.1. Konventionelle Färbung

In der Literatur sind bisher relativ wenig Dosiswirkungskurven -meist für dizentrische Chromosomen oder dizentrische plus Ringchromosomen ($dic + R_C$)- für den Dosisbereich von 0,05 - 0,6 Gy veröffentlicht worden. Dies liegt sicher wesentlich in dem verhältnismäßig hohen Arbeitsaufwand begründet, da infolge der geringen biologischen Antwort auf niedere Bestrahlungsdosen eine große Zahl von Zellen pro Kurvenpunkt ausgewertet werden muß, um eine statistisch sinnvolle Aussage machen zu können.

Beim Vergleich dieser Befunde findet man teilweise erhebliche Divergenzen, sowohl im Ausmaß der beobachteten Aberrationsfrequenzen, als auch in deren mathematischen Beschreibung. Als Begründung dafür wurden neben unterschiedlichen Bestrahlungs- und Kulturbedingungen, deren Bedeutung für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen verschiedener Laboratorien sicher nicht unterschätzt werden darf, auch zur Zeit noch nicht verifizierte Hypothesen, wie interindividuelle Strahlensensibilität oder ungleich strahlenempfindliche Lymphozytensubpopulationen angeführt.

Da alle im folgenden genannten Arbeitsgruppen für ihre Chromosomenanalyse eine konventionelle Färbemethode benutzten, muß noch ein weiterer wesentlicher Faktor, nämlich der Ein-

fluß der Lymphozytenzellkinetik, genannt werden. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden und wird in Abschnitt 4.3.2. näher erläutert.

Schmickel (39) behandelte das Blut zwölf gesunder Probanden nach der sogenannten "Makromethode", in der nach dem Zentrifugieren eine Leukozytensuspension dem Kulturmedium zugegeben wurde, worauf die Röntgenbestrahlung mit 100 kV bei 15 mA -vermutlich bei Raumtemperatur (keine Angaben)-durchgeführt wurde. Der Dosisbereich erstreckte sich von 5,6 bis 48 R. Schmickel wählte eine Kulturzeit von 72 Stunden, in der heute als irrtümlich anzusehenden Meinung, daß nach dieser Kulturdauer die analysierten Lymphozyten vornehmlich in ihrer ersten Zellteilung vorlägen.

Abgesehen davon, daß bei zunehmender Kulturdauer infolge der Zellproliferation Aberrationen bei den Zellteilungen verloren gehen, wird die Aberrationsausbeute bei Bestrahlung der Zellen im Medium wiederum größer als bei Bestrahlung des Vollblutes, wie Bajerska und Liniecki (7) in Versuchen über verschiedene Bestrahlungsbedingungen nachwiesen. Diese Arbeitsgruppe fand auch, in Übereinstimmung mit Lloyd und Mitarb. (30), daß bereits geringfügige Unterschreitungen der Bestrahlungstemperatur von 37°C verminderte Aberrationsraten nach sich zogen. Infolge der durch die geringe Anzahl ausgewerteter Zellen (zwischen 229 und 639 pro Dosis) bedingten großen Konfidenzbereiche sah sich Schmickel außerstande, eine verlässliche Kurve für $\text{dic} + R_c$ anzupassen und postulierte die Beschränkung der biologischen Dosimetrie auf Bereiche über 50 R.

Buckton und Mitarb. (12) bestrahlten Blutproben in vitro zwischen 30 und 50 rad mit 2-MeV-Röntgenstrahlen bei Zimmertemperatur und zählten $\text{dic} + R_c$ aus. Es wurde ähnlich wie in der hier vorliegenden Arbeit eine Mikromethode be-

nutzt, die Kulturzeit betrug 45 und 48 Stunden, die Zahl der analysierten Zellen war pro Dosis entweder 100 oder 200.

Da insgesamt nur 1000 Zellen erfaßt wurden, konnte wegen der geringen Aberrationsraten keine Dosiswirkungsbeziehung erstellt werden. Allerdings wurde aus Blutproben von 22 ganzkörperbestrahlten Krebspatienten (17-50 rad) eine Kurve für die $+ R_c$ bestimmt und für die Potenzfunktion $y = c + \alpha \cdot D^n$ die Dosisexponenten $n = 0,86$ für Blutabnahmen unmittelbar nach Strahlenexposition, sowie $n = 1,59$ für 24 Stunden später angegeben.

Schmid und Mitarb. (42) konnten in einer ähnlichen Studie zeigen, daß diese Befunde von Buckton auch mit einer linearen Dosiswirkungsbeziehung zu vereinbaren sind, was aufgrund theoretischer Vorstellungen für diesen niederen Dosisbereich zu erwarten ist. In eigenen Untersuchungen (Makrokulturen, 48 Stunden) fanden Schmid und Mitarb. (42) jeweils lineare Dosiswirkungsbeziehungen für die $+ R_c$ in Blutproben von 15 Krebspatienten nach Ganzkörperexposition mit ^{60}Co - γ -Strahlen (jeweils 2000 Zellen für 10, 19, 29 rad):
 $y = 1,95 \cdot 10^{-3} + (0,24 \pm 0,08) \cdot 10^{-3} \cdot D$ sowie in Blutproben dieser unbestrahlten Patienten nach in vitro Exposition mit 10-37 rad (1000 Zellen pro Punkt):
 $y = -3,81 \cdot 10^{-3} + (0,46 \pm 0,27) \cdot 10^{-3} \cdot D$.

In beiden Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, daß die Aberrationsraten nach in vitro und in vivo Bestrahlung in vergleichbaren Dimensionen lagen. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für eine biologische Dosisabschätzung.

In einem Experiment mit ^{60}Co - γ -Strahlen (Makrokulturen, 50 Stunden) im Dosisbereich von 5-40 rad (jeweils 500 Zellen von 3 Probanden) beschrieben Luchnik und Sevankaev (32) für die Häufigkeit dizentrischer Chromosomen ein signifikantes Plateau zwischen 10 und 30 rad.

Kučerová und Mitarb. (28) bestrahlten 6 Blutproben 3 verschiedener Personen mit 250-kV-Röntgenstrahlen bei 6 mA und variabler Dosisleistung von 12,5-125 R/min im Dosisbereich von 5-50 R (Bestrahlungstemperatur ungenannt). Kultiviert wurden die Proben mit einer Makromethode bei einer Kulturzeit von 45 und 48 Stunden (keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kulturzeiten). Pro Dosis wurden 1500 Zellen ausgewertet. Die Aberrationsausbeute für die + R_c wurde nach logarithmischer Transformation der Daten mit einer linearen Funktion beschrieben: $y = 0,098 + (0,037 \pm 0,006) \cdot D$.

Vulpis und Mitarb. (48), die nach 250-kV-Röntgenbestrahlung (15 mA, Raumtemperatur) ihre Blutproben zunächst 2 Stunden bei 37° C beließen, "damit Reparaturvorgänge stattfinden könnten", kultivierten die Lymphozyten mit einer Mikromethode für 48 Stunden. Im Bereich von 5-60 rad wurden pro Dosis zwischen 4200 und 1200 Zellen ausgewertet. Für die Aberrationsausbeute der dizentrischen Chromosomen gaben sie die folgende lineare Regression an: $y = -0,32 \cdot 10^{-3} + (0,483 \pm 0,074) \cdot 10^{-3} \cdot D$.

Ziembra-Zbátowska und Mitarb. (51) schließlich verabreichten ihren Blutproben 250-kV-Röntgenstrahlen (18 mA, Raumtemperatur) und kultivierten sie mit einer Mikromethode für 50 Stunden. Für 4 Dosen zwischen 11,5 und 57,5 rad wurden zwischen 1000 und 2500 Zellen analysiert. Auch diese Arbeitsgruppe fand, daß die Befunde für die + R_c am besten mit dem linearen Modell zu beschreiben waren: $y = (0,148 \pm 0,205) \cdot 10^{-2} + (0,463 \pm 0,059) \cdot 10^{-3} \cdot D$.

In der vorliegenden Arbeit waren die Befunde für dizentrische Chromosomen (Exp. b, Feulgen-Orcein-Eisessig-Färbung) am besten mit dem linear-quadratischen Modell $y = 0,0014 \cdot D + 0,063 \cdot D^2$ (Dosis in Gy) zu vereinbaren.

Entsprechend einem $\lambda = 0,018$ Gy würde dies bedeuten, daß selbst in diesem niedrigen Dosisbereich dizentrische Chromosomen überwiegend durch Wechselwirkung von 2 Primärbrüchen, die durch 2 verschiedene Bahnspuren erzeugt wurden, entstehen. Die Befunde aus Exp. a, die mittels der FPG-Färbung erhoben wurden, widerlegen aber eindeutig einen solchen Wirkungsmechanismus. Die Gründe dafür werden in Abschnitt 4.3.2. besprochen.

Dosiswirkungsbeziehungen für azentrische Fragmente ($ace + R_0 + min$) wurden bisher nur von 2 der genannten Arbeitsgruppen untersucht. In beiden Fällen wurde eine lineare Kinetik angegeben:

Kučerová und Mitarb. (28) nach logarithmischer Transformation:
 $y = 0,497 + (0,023 \pm 0,007) \cdot D.$

Ziemia-Zbłotowska und Mitarb. (51):
 $y = 0,746 \cdot 10^{-2} + (0,679 \pm 0,125) \cdot 10^{-3} \cdot D.$

Aus dem eigenen Exp. b konnte ebenfalls eine lineare Beziehung mit dem Koeffizienten $k = 0,0215$ ($y = k \cdot D$, Dosis in Gy) abgeleitet werden.

Ein Vergleich der mit konventionellen Färbemethoden für dic bzw. dic + R_0 sowie für ace erhobenen Befunde verschiedener Autoren untereinander sowie dieser Befunde mit den eigenen Ergebnissen ergibt zum Teil beträchtliche Diskrepanzen. Dies gilt sowohl für die beobachteten Aberrationsraten wie auch für die theoretischen Kurven.

Die Entstehung dieser unterschiedlichen Resultate kann u.a. durch unterschiedliche Bestrahlungs- und Kulturbedingungen erklärt werden. Hierbei beeinflussen mehrere Faktoren die Aberrationsausbeute. Die Befunde wurden mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten erhoben, die mit verschiedenen Dosisleistungen bei verschiedenen Temperaturen appliziert

wurden. Kulturdauer und Zusammensetzung des Kulturmediums, hier insbesondere die Endkonzentration des Mitogens PHA, die wegen des Einflusses auf die Proliferationskinetik speziell für Chromosomenanalysen mit konventioneller Färbung bedeutsam ist, waren weitgehend verschieden.

Wegen der unterschiedlichen mathematisch-statistischen Behandlung der Daten -die Anpassung von Modellen erfolgte zum Teil mit verschiedenen Fitprogrammen oder es wurden lediglich Funktionen berechnet- sind die einzelnen Dosiswirkungskurven nicht direkt miteinander vergleichbar.

Um alle eben erwähnten und für die unterschiedlichen Aberrationsausbeuten der einzelnen Laboratorien verantwortlichen Ursachen auszuschließen, müßten entweder genau definierte und von allen Arbeitsgruppen akzeptierte standardisierte Bestrahlungs- und Kulturbedingungen zugrundegelegt werden oder, wie Dolphin und Purrott (19) und Vulpis und Mitarb. (48) gefordert haben, jedes Laboratorium müßte für jede Strahlenart und jeden Dosisbereich seine eigenen Eichkurven anfertigen.

Aber auch dann könnten wegen der inter- und intraindividuellen Variabilität in der Transformations- und Proliferationskinetik der Lymphozyten unterschiedliche Ergebnisse nicht auszuschließen sein. Denn obwohl der Aberrationsverlust bei Zellteilungen bereits sehr früh (13, 14) als mögliche Fehlerquelle bei der Beurteilung strahleninduzierter Chromosomenschäden erkannt wurde, die man durch möglichst kurze Kulturzeiten (in der Regel 48 Stunden) auszuschließen versuchte, konnte mit der FPG-Färbung durch den Nachweis einer relativ hohen Zahl von M_2 -Zellen selbst bei 48-Stunden-Kulturen (18, 27, 44) belegt werden, daß bei konventioneller Färbung der Unsicherheitsfaktor der Proliferationskinetik nicht eliminiert werden kann.

Bei genügend hohen Bestrahlungsdosen wird dies durch die strahleninduzierte Mitoseverzögerung mit dadurch bedingtem Absinken des M_2 -Anteils teilweise kompensiert. In dem hier gewählten niederen Dosisbereich aber erfolgt keine strahleninduzierte Proliferationshemmung, wie in der Abb. 4 der sehr einheitliche M_2 -Index zwischen 26 und 29,5% zeigt.

Der Abfall der M_2 -Raten bei den beiden kleinsten Bestrahlungsdosen dürfte wohl durch kleinere Schwankungen in der Zusammensetzung der einzelnen Bestandteile der Kulturen bedingt sein, wie etwa verringerte PHA- oder BrdU-Konzentrationen oder eine geringfügig erhöhte Vollblutmenge, bzw. durch minimale Verzögerungen bis zum Erreichen der Inkubationstemperatur von 37° C. Möglicherweise wirkten mehrere Faktoren additiv. Wie im hiesigen Labor bei acht Probanden durchgeführte Untersuchungen (persönliche Mitteilung von Fr. Bamberg) über den Temperatureinfluß auf die Zellkinetik darlegten, bewirkt eine über 48 Stunden konstante Temperaturerniedrigung von 37° auf 36° C eine Verminderung der M_2 -Zellen um bis zu 37%!

Sicherlich ist als Ursache eine bestrahlungsbedingte Mitoseverzögerung auszuschließen, die nach Vulpis und Mitarb. (49) bei 7-10% weniger M_2 -Zellen pro 1,0 Gy, nach Lloyd und Mitarb. (31) zwischen 1,5 Gy und 4,0 Gy in der Größenordnung einiger Stunden, nach Purrott und Mitarb. (34) bei einer Stunde pro 1,0 Gy lag. Diese Mitoseverzögerung müßte sich, wenn überhaupt in dem hier gewählten niederen Dosisbereich, somit eher bei den höheren Dosen manifestieren.

Da also im niederen Dosisbereich keine Mitoseverzögerung nachweisbar ist und die Höhe des Aberrationsverlustes bei Zellteilungen mit der Höhe des prozentualen Anteils von M_2 -Zellen korreliert ist, bei konventioneller Färbung aber die M_2 -Zellen nicht identifiziert werden können, dürfte

dieser Umstand wohl die Hauptursache für die divergierenden Ergebnisse bei der Darstellung von Dosiswirkungsbeziehungen speziell im niederen Dosisbereich bei Anwendung konventioneller Färbung sein.

4.3.2. FPG-Färbung

Mit Hilfe der FPG-Färbung können Zellen in ihrer 1. Teilung (M_1) von Zellen in der 2. (M_2) oder späteren Teilung unterschieden werden. Die Analyse von Dosiswirkungsbeziehungen kann somit ausschließlich mit M_1 -Zellen durchgeführt werden. Um die Vorteile einer solchen Bewertung zu erkennen, soll zunächst das Schicksal von Zellen mit Chromosomendefekten betrachtet werden.

Da die in vitro Bestrahlung der Lymphozyten in deren G_0 -Phase, also vor einer DNA-Synthese erfolgt, ergibt die Aberrationsausbeute der ersten mitotischen Teilung, soweit die Zellen bei hohen Dosen nicht vom Interphasetod betroffen sind (31) ein verlässliches Bild der tatsächlich erfolgten Strahlenschädigung der Chromosomen.

Schon 1964 konstatierten Buckton und Pike (13, 14) bei zunehmender Kulturzeit von 48 bis 72 Stunden, wenn also zunehmend M_2 -Zellen zur Auswertung gelangen, eine ständige Abnahme sogenannter C_u -Zellen (Zellen mit unstabilen Chromosomenaberrationen wie Ringchromosomen und polyzentrischen Chromosomen). Ähnliche Befunde stammen von Heddle, Evans und Scott (22).

Die Wahrscheinlichkeit, daß Zwei-Bruch-Aberrationen ihre erste Zellteilung überstehen, beträgt nach überzeugenden Berechnungen von Carrano und Heddle (16) nur 50%, d.h., eine freie Transmission von z.B. dizentrischen Chromosomen in die beiden Tochterzellen mit anschließender komplika-

tionsloser Zellteilung erfolgt nur in der Hälfte der Fälle. In den anderen Fällen kommt es zu einer Brückenbildung während der Anaphase, die entweder eine reguläre Teilung überhaupt verhindert -mit konsekutivem Zelltod oder Polyploidie- oder einen Brückenriß -mit bisher unbekannten Konsequenzen- zur Folge hat.

Scott und Lyons (44) sowie Kolin-Gerresheim und Bauchinger (26) fanden nach Anwendung der FPG-Färbung, daß die Raten dizentrischer Chromosomen der ersten Mitose nach PHA-Zugabe ca. doppelt so hoch wie die der zweiten Mitose waren. Darüberhinaus stellten Scott und Lyons (44) ebenso wie Leonard und Decat (29) fest, daß trotz zunehmender Kulturzeit die Aberrationsquote konstant blieb, wenn nur M_1 -Zellen analysiert wurden.

Azentrische Fragmente überleben nach Carrano und Heddle (16) die erste Mitose zu 80%, wobei die Einbeziehung in einen der Tochterzellkerne infolge des Zentromerverlustes zufällig erfolgt:

-Gelingen beide Chromatiden des Fragmentes in einen Tochterzellkern, dann würde der Bestrahlungsschaden dieser in der darauffolgenden Metaphase beurteilten Tochterzelle (wegen der DNA-Synthese, in der das Fragment repliziert wird) als doppelt so hoch wie ursprünglich induziert imponieren. Die andere Tochterzelle aber würde, falls dabei nicht essentielle genetische Information verloren ging, unter Umständen als "normal" gewertet werden und erst im Laufe späterer Zellteilung zugrunde gehen.

-Erhält jeder Tochterzellkern in gleicher Weise eine Chromatide (was nur zu 3% der Fall ist), dann würden in der zweiten Teilung wiederum zwei Zellen mit je einem azentrischen Fragment gezählt werden.

-Geht das azentrische Fragment während der Teilung ganz

verloren, söge dies für die zweite Mitose wiederum eine Unterbewertung des ursprünglich gesetzten Schadens mit zwei als "normal" beurteilten Zellen nach sich.

Außerdem würden z.B. Aberrationen vom Chromatidtyp aus der ersten Mitose -je nach Konfiguration- in der zweiten Mitose entweder als "normal" oder als Aberrationen vom Chromosomentyp imponieren (sogenannte "abgeleitete Aberrationen vom Chromosomentyp", vgl. Schema in Bauchinger (5)). Dies bedeutet, daß bei konventioneller Färbung neben der quantitativen auch eine qualitative Fehlbewertung des induzierten Chromosomenschadens möglich ist.

Um diese der konventionellen Färbemethode immanenten Fehlerquellen auszuschließen, wurde von verschiedenen Autoren eine Kulturzeit gefordert -im allgemeinen nicht unter 48 Stunden-, in der sich ihrer Meinung nach nur Zellen der ersten Mitose befänden. Allerdings stehen dem Befunde gegenüber, die diese Annahme nicht rechtfertigen: so fanden Lloyd und Mitarb. (31) schon bei 40-Stunden-Kulturen einige, Bianchi und Mitarb. (9) bei 44-Stunden-Kulturen 12% M_2 -Zellen. In 48-Stunden-Kulturen zählten zwar Tice und Mitarb. (47) nur einzelne M_2 -Zellen, ebenso Leonard und Decat (29) nur 3%, aber Crossen und Morgan (18) bis zu 53%, Scott und Lyons (44) 48%, Buul und Natarajan (15) 19%, Furrot und Vulpis (34) 14% und Kolin-Gerresheim und Bauchinger (27) zwischen 24% und 64% M_2 -Zellen.

Auch die in der hier vorgelegten Arbeit gefundenen M_2 -Indices, die mit den zwei bereits diskutierten Ausnahmen zwischen 26% und 29% schwanken, widersprechen der Annahme, in 48-Stunden-Kulturen ausschließlich M_1 -Zellen zu finden.

Diese Befunde beweisen, daß zwar in Einzelfällen durch eine entsprechend kurz gewählte Kulturzeit der Anteil der M_2 -Metaphasen minimalisiert werden kann, generell aber infolge der starken interindividuellen Unterschiede in den Teilungsgeschwindigkeiten die ausschließliche Wertung von M_1 -Zellen (durch FPG-Färbung) als die Methode angesehen werden muß, um verläßliche Angaben über den chromosomalen Strahlenschaden machen zu können.

Vergleicht man die mit unterschiedlichen Färbemethoden aus Exp. a und b dieser Arbeit erhobenen Befunde für dizentrische Chromosomen miteinander, so erkennt man zum einen, daß die absolute Aberrationsausbeute bei FPG-Färbung doppelt so hoch ist wie bei konventioneller Färbung, was nach den vorausgegangenen Ausführungen verständlich wird, und zum anderen, daß mit der FPG-Färbung die theoretischen Vorstellungen über eine lineare Dosiswirkungsbeziehung im niederen Dosisbereich experimentell verifiziert werden konnten.

Obwohl für den untersuchten Dosisbereich eine linear-quadratische Anpassung für beide Färbemethoden erfolgte, war bei der FPG-Färbung eine deutliche Prädominanz des linearen Anteils ersichtlich, während die quadratische Komponente erst außerhalb des hier gewählten Dosisbereichs zu überwiegen begann ($\lambda = 0,6$ Gy). Bei der Feulgen-Orcein-Eisessig-Färbung war dieses Kurvenverhalten nicht reproduzierbar, vielmehr wäre hier, wegen des sehr geringen Wertes von $\lambda = 0,018$ Gy, über den gesamten Dosisbereich ein Überwiegen der quadratischen Komponente abzuleiten.

Der Vergleich der Befunde für azentrische Fragmente ($ace + + min + R_0$) zeigt zwar für beide Färbemethoden analog den theoretischen Erwartungen eine lineare Dosiswirkungsbeziehung, die absolute Ausbeute bei FPG-Färbung ist allerdings

-über den gesamten Dosisbereich betrachtet- ca. dreimal so hoch wie bei konventioneller Färbung. Dies deutet wiederum darauf hin, daß während der Zellproliferation viele Fragmente verloren gehen, was bei konventioneller Färbung nicht erfaßt wird. Dabei sind die Verlustraten höher als sie von Carrano und Heddle (16) mit 20% berechnet wurden.

Mit Hilfe der von Carrano und Heddle (16) gefundenen Wahrscheinlichkeit der Transmission von Chromosomenaberrationen in die nächste Mitose sowie den in Parallelkulturen bestimmten Häufigkeiten von M_2 -Zellen wurden von Buul und Natarajan (15) nach Röntgenbestrahlung mit 1,0 und 2,0 Gy die mit konventioneller Färbung bestimmten Aberrationsraten korrigiert. Sie fanden dabei, daß diese korrigierten Raten gut mit jenen übereinstimmen, die bei ausschließlicher Auswertung von M_1 -Zellen bestimmt wurden.

Obwohl die korrigierten Frequenzen infolge mangelhafter Angaben über den Rechengang nicht reproduzierbar waren, soll hier die Relevanz solcher Korrekturen nicht angezweifelt werden, solange sie nur speziell bezüglich eines jeweiligen Spenders und Experimentes angewandt werden. Denn, wie die von Kolin-Gerresheim (persönliche Mitteilung) im hiesigen Labor bei über längere Zeitintervalle hinweg mit dem hier benutzten Spenderblut und konstanter Kulturzeit durchgeführten M_2 -Index-Bestimmungen zeigten, unterliegt die Teilungsgeschwindigkeit der menschlichen Lymphozyten in vitro auch beträchtlichen intraindividuellen Schwankungen.

Die beobachteten prozentualen M_2 -Raten, einschließlich des M_2 -Index aus Exp. b (Abb. 4), sind unten in der Reihenfolge der Blutabnahme tabelliert:

09.06.1980: 65%
25.06.1980: 28%, (Exp. b)
09.12.1980: 35%
04.05.1981: 62%
31.08.1981: 51%
05.10.1981: 55%

Die BrdU-Endkonzentration war jeweils 5,8 $\mu\text{g/ml}$.

Somit ist es nicht einzusehen, warum nicht von vorneherein der FPG-Färbung der Vorzug vor konventioneller Färbung mit parallel durchzuführender M_2 -Index-Zählung gegeben werden soll.

Als mögliche Nachteile der FPG-Färbung könnten die Beeinflussung der Zellkinetik durch BrdU einerseits und der klastogene Effekt des BrdU andererseits angeführt werden. Allerdings kamen vier Arbeitsgruppen unabhängig voneinander zu dem Ergebnis, daß das BrdU in den von ihnen verwendeten Konzentrationen keine Erhöhung der Aberrationsausbeute nach sich zog:

Scott und Lyons (44):	7,5 $\mu\text{g/ml}$ BrdU-Endkonzentration
Bianchi und Mitarb. (9):	10 $\mu\text{g/ml}$ BrdU-Endkonzentration
Leonard und Decat (29):	10 $\mu\text{g/ml}$ BrdU-Endkonzentration
Buul und Natarajan (15):	10 $\mu\text{g/ml}$ BrdU-Endkonzentration

Für die hier in Exp. a verwendete BrdU-Endkonzentration von 5,8 $\mu\text{g/ml}$ kann somit ein synergistischer Effekt auf die Aberrationsausbeute -jedenfalls für die zur biologischen Dosimetrie verwendeten Aberrationen vom Chromosomentyp (dic, ace)- ausgeschlossen werden.

Ein schwierigeres Problem stellt die Vermeidung hemmender Effekte des BrdU auf die Proliferationsgeschwindigkeit der Lymphozyten dar, da der Schwellenwert für die noch akzeptable Konzentration nahe dem Wert liegt, unterhalb dessen bei

schnell proliferierenden Lymphozyten die Menge des in die DNA eingebauten BrdU nicht mehr für eine sichere Differenzierung der Chromatiden genügt.

Tice, Schneider und Rary (47) fanden erst bei 10,5 $\mu\text{g/ml}$ eine beginnende, Wyszynska und Liniecki (50) bei 8 $\mu\text{g/ml}$ noch keine Mitoseverzögerung, aber Scott und Lyons (44) beschrieben bereits bei 10 $\mu\text{g/ml}$ einen "beträchtlich" niedrigeren prozentualen Anteil von M_2 -Zellen als bei 5 $\mu\text{g/ml}$. Kolin-Gerresheim und Bauchinger (27) schließlich demonstrierten anhand von Konzentrationskurven bei 7 verschiedenen Spendern, daß bei einer BrdU-Konzentration von 0,75 $\mu\text{g/ml}$ bis 3 $\mu\text{g/ml}$ die Zahl der M_2 -Zellen unverändert blieb, zwischen 3 und 6 $\mu\text{g/ml}$ zu sinken begann, um dann bei höheren Konzentrationen in einen kontinuierlichen Abfall überzugehen.

Die in dieser Arbeit verwendete Endkonzentration von 5,8 $\mu\text{g/ml}$ wurde aufgrund dieser Erkenntnisse gewählt und war von vernachlässigbarem Effekt auf die Zellteilungskinetik.

4.4. Bewertung

Bei Untersuchungen der Dosiswirkungsbeziehungen strahlen-induzierter Chromosomenschäden kann -unter standardisierten Bestrahlungs- und Kulturbedingungen- durch Anwendung der FPG-Färbung die Zellkinetik der Lymphozyten beurteilt werden.

Im Gegensatz zu einer konventionellen Färbung kann mit Hilfe der FPG-Färbung die Chromosomenanalyse ausschließlich in Zellen der ersten Teilung (M_1) durchgeführt werden, so daß keine durch die Zellproliferation bedingten Aberrationsverluste in Betracht zu ziehen sind. Dies ist von besonderer

Bedeutung im niederen Dosisbereich, weil sich hier eine strahleninduzierte Mitoseverzögerung noch kaum bemerkbar macht. Für die Erstellung von repräsentativen Kalibrierkurven sollte deshalb die FPG-Färbung mit M_1 -Auswertung angewandt werden. Im niederen Dosisbereich empfiehlt sich bei der Erfassung von dic für Dosen $\leq 0,1$ Gy sowie bei ace für Dosen $\leq 0,05$ Gy zur Reduzierung des statistischen Fehlers mehr als 1000 Zellen zu analysieren.

5. Zusammenfassung

Periphere Lymphozyten eines männlichen Spenders wurden in vitro mit 220-kV-Röntgenstrahlen (Dosisleistung = 0,16 Gy/min) der Dosen 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 und 0,5 Gy bestrahlt, anschließend unter standardisierten Bedingungen kultiviert und präpariert.

Die Objektträger wurden nach zwei unterschiedlichen Methoden gefärbt, einmal mit der sogenannten FPG-Färbung (fluorescence plus Giemsa), die eine Differenzierung der Metaphasen der ersten Zellteilung (M_1) von denen folgender Mitosen erlaubt, zum anderen mit einer konventionellen Färbemethode (Feulgen-Orcein-Eisessig-Färbung), bei der diese Unterscheidung nicht möglich ist.

Für die Analyse der Dosiswirkungsbeziehung strahleninduzierter Chromosomendefekte wurden für jede Färbemethode pro Dosis 1000 Zellen ausgewertet.

Im Vergleich zur konventionellen Färbung war mit der FPG-Färbung die absolute Ausbeute für azentrische Fragmente dreimal höher und für dizentrische Chromosomen doppelt so hoch.

Für azentrische Fragmente ergab sich für beide Färbearten eine lineare Dosiswirkungsbeziehung, die den theoretischen Erwartungen entspricht.

Für dizentrische Chromosomen war für beide Färbungen die Dosiswirkungsbeziehung linear-quadratisch.

-Bei FPG-Färbung, mit der nur M_1 -Zellen ausgewertet wurden, dominierte über den gesamten Dosisbereich der lineare Anteil -was mit den theoretischen Vorstellungen übereinstimmt.

-Bei konventioneller Färbung, mit der nicht voneinander unterscheidbare M_1 - und M_2 -Zellen gleichzeitig analysiert

wurden (in Parallelkulturen wurden mit FPG-Färbung 26% - 29% M_2 -Zellen gezählt), herrschte die quadratische Komponente vor.

Die nach FPG-Färbung erstellten Dosiswirkungskurven können als Eichkurven für eine biologische Dosimetrie dienen. Eine verbesserte Kalibrierung kann noch durch eine Erhöhung der analysierten Zellzahlen bei Dosen $\leq 0,1$ Gy erreicht werden.

Literaturverzeichnis

1. Apelt, F., Kolin-Gerresheim, I., Bauchinger, M.
Azathioprine, a clastogen in human somatic cells?
Analysis of chromosome damage and SCE in lymphocytes
after exposure in vivo and in vitro
Mutat. Res. 88 (1981) 61-72
2. Arakaki, D. T., Sparkes, R. S.
Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood
Cytogenetics 2 (1963) 57-60
3. Bauchinger, M.
Strahleninduzierte Chromosomenaberrationen
in: Handbuch der med. Radiologie
herausgeg. von Olsson, O., Strnad, F., Vieten, H.,
Zuppinger, A.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1972) 127-180
4. Bauchinger, M., Götz, G.
Distribution of radiation induced lesions in human
chromosomes and dose-effect relation analysed with
G-banding
Rad. and Environm. Biophys. 16 (1979) 355-366
5. Bauchinger, M., Hug, O.
Chromosomenaberrationen nach Radium-Röntgentherapie
gynäkologischer Tumoren
Strahlentherapie 131 (1966) 109-121

6. Bauchinger, M., Schmid, E., Dresp, J.
Calculation of the dose-rate dependence of the dicentric
yield after Co- γ -irradiation of human lymphocytes
Int. J. Radiat. Biol. 35 (1979) 229-232
7. Bajerska, A., Liniecki, J.
The influence of temperature at irradiation in vitro
on the yield of chromosomal aberrations in peripheral
blood lymphocytes
Int. J. Radiat. Biol. 16 (1969) 483-493
8. Bender, M. A., Gooch, P. C.
Types and rates of X-ray-induced chromosome aberrations
in human blood irradiated in vitro
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 48 (1962) 522-532
9. Bianchi, N. O., Bianchi, M. S., Larramendy, M.
Kinetics of human lymphocyte division and chromosomal
radiosensitivity
Mutat. Res. 63 (1979) 317-324
10. Brewen, J. G., Luippold, H. E.
Radiation-induced human chromosome aberrations: in vitro
dose rate studies
Mutat. Res. 12 (1971) 305-314
11. Buckton, K. E.
Identification with G- and R-banding of the position of
breakage points induced in human chromosomes by in vitro
X-irradiation
Int. J. Radiat. Biol. 29 (1976) 475-488

12. Buckton, K. E., Langlands, A. O., Smith, P. G.,
Woodcock, G. E., Looby, P. C., McLelland, J.
Further studies on chromosome aberration production
after whole-body irradiation in man
Int. J. Radiat. Biol. 19 (1971) 369-378
13. Buckton, K. E., Pike, M. C.
Chromosome investigations on lymphocytes from irradiated
patients: Effect of time in culture
Nature 202 (1964 a) 714-715
14. Buckton, K. E., Pike, M. C.
Time in culture - an important variable in studying in
vivo radiation-induced chromosome damage in man
Int. J. Radiat. Biol. 8 (1964 b) 439-452
15. Buul, van, P. P. W., Natarajan, A. T.
Chromosomal radiosensitivity of human leucocytes in
relation to sampling time
Mutat. Res. 70 (1980) 61-69
16. Carrano, A. V., Heddle, J. A.
The fate of chromosome aberrations
J. theor. Biol. 38 (1973) 289-304
17. Catcheside, D. G., Lea, D. E., Thoday, J. M.
Types of chromosome structural change induced by the
irradiation of Tradescantia microspores
J. Genet. 47 (1946) 113-136

18. Crossen, P. E., Morgan, W. F.

Analysis of human lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining

Exp. Cell Res. 104 (1977) 453-457

19. Dolphin, G. W., Purrott, R. J.

Use of radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes for dosimetry

in: Advances in physical and biological radiation detectors

herausgeg. von IAEA, Wien (1971) 611-622

20. Evans, H. J.

Dose-response relations from in vitro studies

in: Human Radiation Cytogenetics, North-Holland, Amsterdam

herausgeg. von Evans, H. J., Court Brown, W. M.,

McLean, A. S. (1967) 20-36

21. Hall, E. J., Miller, R. C.

The how and why of in vitro oncogenic transformation

Radiat. Res. 87 (1981) 208-223

22. Heddle, J. A., Evans, H. J., Scott, D.

Sampling time and the complexity of the human leucocyte culture system

in: Human Radiation Cytogenetics, North-Holland, Amsterdam

herausgeg. von Evans, H. J., Court Brown, W. M.,

McLean, A. S. (1967) 6-19

23. Kellerer, A. M. Brenot, J.

On the statistical evaluation of dose-response function

Rad. and Environm. Biophys. 11 (1974) 1-13

24. Kellerer, A. M., Chmelevsky, D., Hall, E. J.
Nonparametric representations of dose-effect relations
Radiat. Res. 84 (1980) 173-188
25. Kellerer, A. M., Hug, O.
A. Theory of dose-effect relations
in: Handbuch der med. Radiologie
herausgeg. von Olsson, O., Strnad, F., Vieten, H.,
Zuppinger, A.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1972) 1-42
26. Kolin-Gerresheim, I., Bauchinger, M.
Analysis of cell kinetics of human lymphocytes and
aberration yields in first (M I) and second (M II)
post irradiation divisions by FPG-staining
Rad. and Environm. Biophys. 17 (1980) 244 (Abstract)
27. Kolin-Gerresheim, I., Bauchinger, M.
Dependence of the frequency of harlequin-stained cells
on BrdU concentration in human lymphocyte cultures
Mutat. Res. 91 (1981) 251-254
28. Kučerová, M., Anderson, A. J. B., Buckton, K. E.,
Evans, H. J.
X-ray-induced chromosome aberrations in human peripheral
blood leucocytes: The response to low levels of exposure
in vitro
Int. J. Radiat. Biol. 21 (1972) 389-396
29. Leonard, A., Decat, G.
Relation between cell cycle and yield of aberrations
observed in irradiated human lymphocytes
Can. J. Genet. Cytol. 21 (1979) 473-478

30. Lloyd, D. C., Purrott, R. J., Dolphin, G. W.,
Dawn Bolton, Edwards, A. A., Corp, M. J.

The relationship between chromosome aberrations and
low LET radiation dose to human lymphocytes
Int. J. Radiat. Biol. 28 (1975) 75-90

31. Lloyd, D. C., Dolphin, G. W., Purrott, R. J.,
Tipper, P. A.

The effect of X-ray induced mitotic delay on chromosome
aberration yields in human lymphocytes
Mutat. Res. 42 (1977) 401-412

32. Luchnik, N. V., Sevankaev, A. V.

Radiation-induced chromosomal aberrations in human
lymphocytes.

I. Dependence on the dose of γ -rays and an anomaly at
low doses

Mutat. Res. 36 (1976) 363-378

33. Perry, P., Wolff, S.

New giemsa method for the differential staining of
sister chromatids

Nature (London) 252 (1974) 156-158

34. Purrott, R. J., Vulpis, N., Lloyd, D. C.

The use of harlequin staining to measure delay in the
human lymphocyte cell cycle induced by in vitro X-irradiation
Mutat. Res. 69 (1980) 275-282

35. Sax, K.

Chromosome aberrations induced by X-rays
Genetics 23 (1938) 494-516

36. Sax, K.

The time factor in X-ray production of chromosome aberrations

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 25 (1939) 225-233

37. Sax, K.

An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in Tradescantia

Genetics 25 (1940) 41-68

38. Sax, K.

Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by X-rays

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 2 (1941) 93-101

39. Schmickel, R.

Chromosome aberrations in leukocytes exposed in vitro to diagnostic levels of X-rays

American J. of Human Genetics 19 (1967) 1-11

40. Schmid, E., Bauchinger, M.

Über das zeitlich Verhalten strahleninduzierter Chromosomenaberrationen beim Menschen

Mutat. Res. 8 (1969) 599-611

41. Schmid, E., Bauchinger, M.

Analysis of primary processes in the formation of acentric fragments

Rad. and Environm. Biophys. 17 (1980) 143-149

42. Schmid, E., Bauchinger, M., Bunde, E., Ferbert, H. F., Lieven, von, H.

Comparison of the chromosome damage and its dose response after medical whole-body exposure to

⁶⁰Co-γ-rays and irradiation of blood in vitro

Int. J. Radiat. Biol. 26 (1974) 31-37

43. Schmid, E., Rimpl, G., Bauchinger, M.

Dose-response relation of chromosome aberrations in human lymphocytes after in vitro irradiation with 3-MeV electrons

Radiat. Res. 57 (1974) 228-238

44. Scott, D., Lyons, C. Y.

Homogeneous sensitivity of human peripheral blood lymphocytes to radiation-induced chromosome damage

Nature 278 (1979) 756-758

45. Sehested, K.

The Fricke dosimeter

in: Manual on Radiation Dosimetry, New York

herausgeg. von Holm, N. W., Berry, R. J. (1970) 313-317

46. Stadler, L. J.

The experimental modification of heredity in crop plants.

I. Induced chromosomal irregularities

Sci. Agr. 11 (1931) 557-572

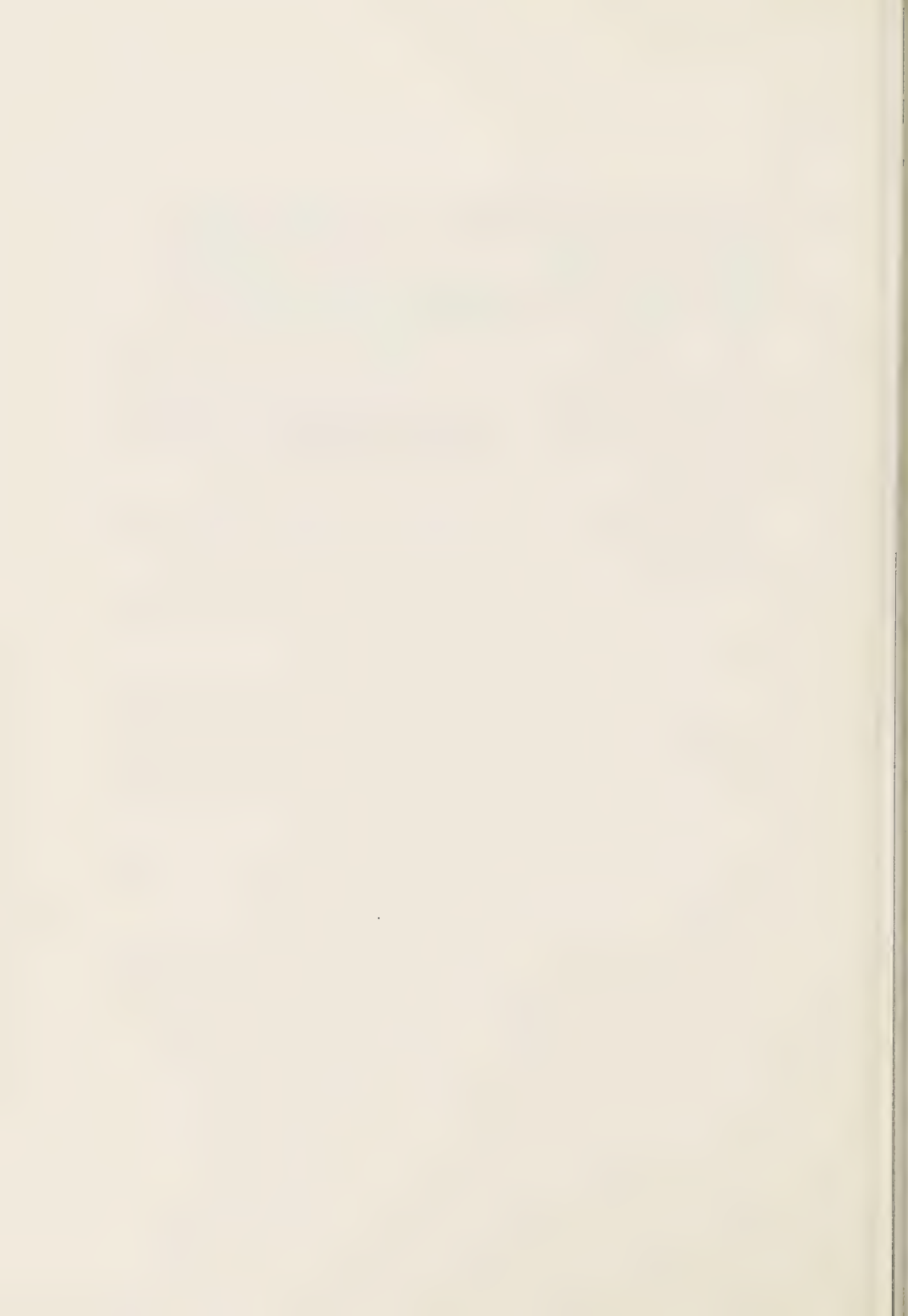
47. Tice, R., Schneider, E. L., Rary, J. M.

The utilization of Bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics

Exp. Cell Res. 102 (1976) 232-236

48. Vulpis, N., Panetta, G., Tognacci, L.
Radiation-induced chromosome aberrations in radiological protection
Dose-response curves at low dose-levels
Int. J. Radiat. Biol. 29 (1979) 595-600
49. Vulpis, N., Purrott, R. J., Lloyd, D. C.
The use of harlequin staining to assess radiation effects on the in vitro cell cycle kinetics of human lymphocytes
Mutat. Res. 51 (1978) 145-148
50. Wszyńska, K., Liniecki, J.
The yield of radiation-induced chromosomal aberrations in lymphocytes as related to the time of arrival at first post-stimulation mitosis
Mutat. Res. 73 (1980) 101-114
51. Ziemia-Złotowska, B., Bocian, E., Rosiek, O., Sabliński, J.
Chromosome aberrations induced by low doses of X-rays in human lymphocytes in vitro
Int. J. Radiat. Biol. 37 (1980) 231-236

Für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, die Betreuung und die kritischen Anregungen während der Fertigstellung der Arbeit gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. M. Bauchinger. Herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. A. M. Kellerer, Institut für medizinische Strahlenkunde der Universität Würzburg, für seine Hilfe bei der statistischen Analyse, Herrn Priv.-Doz. Dr. E. Lengfelder, Institut für Strahlenbiologie der Universität München, für seine Unterstützung bei der Erstellung der Dosimetrie, Frau Dipl.-Biol. I. Kolin-Gerresheim für methodische Hilfen und wertvolle Kritik sowie Frau Rocznik für die Photoarbeiten.



Lebenslauf

Am 14. Mai 1955 wurde ich als drittes der sechs Kinder des Landwirtes Alois Wagner und seiner Ehefrau Maria, geb. Mendle, in Mönstetten, Landkreis Günzburg a.d. Donau, geboren.

Ab 1961 besuchte ich für vier Jahre die Volksschule in Mönstetten, anschließend den humanistischen Zweig des Johann-Michael-Sailer-Gymnasiums in Dillingen a.d. Donau, wo ich am 22. Juni 1974 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Dezember 1974 bis März 1976 leistete ich in der Chirurgischen Klinik Dr. Schreiber in München den Zivildienst ab.

Vom SS 1976 an studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Medizin, legte dort im Oktober 1982 das Staatsexamen ab und erhielt am 25. Oktober 1982 die Approbation als Arzt.

